

*Sticta*-suvun jäkälien fotobionttien geneettinen monimuotoisuus  
Kenian Taitavuorilla

Maisterintutkielma  
Anna Parviainen  
Helsingin yliopisto  
Bio- ja ympäristötieteellinen  
tiedekunta 2019  
Ohjaajat: Ulla Kaasalainen ja Jouko  
Rikkinen

## Tiivistelmä

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		
Tekijä – Författare – Author Anna Parviainen		
Työn nimi – Arbetets titel – Title <i>Sticta</i> -suvun jäkälien fotobionttien geneettinen monimuotoisuus Kenian Taitavuorilla		
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Biologia		
Työn laji – Arbetets art – Level Maisterintutkielma	Aika – Datum – Month and year 02/2020	
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Jäkälät ovat sieniosakkaan ja yhteyttävän levän muodostamia symbiooseja, joista suurin osa elää maaekosysteemeissä ympäri maapalloa. Jäkälät toimivat ekosysteemeissä tärkeinä indikaattorilajeina, sillä ne ovat usein hyvin herkkiä elinympäristössä tapahtuville muutoksille, esimerkiksi ilmanlaadun huononemiselle.</p> <p><i>Sticta</i>-suvun syanojäkäliä on tähän mennessä kuvattu noin 200 lajia erityisesti subtrooppisilta ja trooppisilta alueilta. Todellisuudessa lajimäärän arvioidaan olevan paljon suurempi. Afrikan jäkälistä tiedetään vielä suhteellisen vähän, ja tietomme Itä-Afrikan <i>Sticta</i>-lajeista pohjautuvat pääasiassa 1980-luvulla tehtyyn tutkimukseen. Tässä tutkimuksessa tavoitteenani oli tuottaa DNA- analyysiin</p> <p>perustuva selvitys <i>Sticta</i>-suvusta Kenian Taitavuorilla. Tutkimuksessa selvitin myös <i>Sticta</i>-lajien symbioottisten syanobakteerigenotyyppien levinneisyyttä Taitavuorten eri metsäsaarekkeissa ja eri <i>Sticta</i>-lajeissa.</p> <p>Tutkimukseni aineistona oli 176 jäkälänäytettä, jotka ovat kerätty Taitavuorten alueelta sekä Elgonvuoren rinteeltä Länsi-Keniasta Jouko Rikkisen ja Ulla Kaasalaisen toimesta vuosina 2009- 2017. Alustava lajinmäärittäminen morfologian perusteella tapahtui mikroskopoimalla. Neljänkymmenen kahdeksan näytteen tarkempi lajinmäärittäminen tehtiin DNA-menetelmin, selvittämällä jokaisesta näytteestä sienen sekä syanobakteerin genotyyppi. DNA-eristyksen, PCR:n sekä elektroforeesin keinoin Helsingin luonnontieteellisen museon laboratorioissa kesällä 2018. DNA- sekvensointi tehtiin Sanger-menetelmällä Saksassa GATC Biotech-yrityksen toimesta.</p> <p>Laboratoriotöiden tuloksena sain sieniosakkaan DNA-sekvenssin kaikkiaan 48 jäkälänäytteistä. Sekvenssien perusteella 46 näytettä voitiin määrittää ennestään tunnetuiksi <i>Sticta</i>-lajeiksi, ja kaksi näytettä osoittautui <i>Sticta pseudosylvatica</i> -lajille sukua olevaksi, toistaiseksi kuvaamattomaksi lajiksi. Näytteistä löytyi kaikkiaan 21 erilaista syanobakteerigenotyyppiä. Eri metsäsaarekkeista kerättyjen näytteiden syanobakteerikoostumus ei näyttänyt poikkeavan toisistaan, mutta <i>Sticta</i>- lajien syanobakteerikannat poikkesivat toisistaan.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Taitavuoret, Kasigau, <i>Sticta</i> , jäkäläsymbioosi, syanojäkäli, syanobakteeri		
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Ulla Kaasalainen ja Jouko Rikkinen		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helsingin yliopisto		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		

## Tiivistelmä

## Sisällys

1.	Johdanto	5
<b>1.1</b>	<b><i>Tutkimuksen taustaa</i></b>	<b>5</b>
<b>1.2</b>	<b><i>Tutkimusalue</i></b>	<b>6</b>
1.2.1	Tutkimusalueen sijainti	6
1.2.2	Ilmasto	7
1.2.3	Kasvillisuus	8
2.	Jäkälät	10
<b>2.1</b>	<b><i>Jäkälien lisääntyminen</i></b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b><i>Syanojäkälät ja Nostoc-suku</i></b>	<b>11</b>
<b>2.3</b>	<b><i>Sticta-suvun syanojäkälät</i></b>	<b>14</b>
3.	Aineisto ja menetelmät	15
<b>3.1</b>	<b><i>Näyteaineisto ja keruupaikat</i></b>	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b><i>DNA-menetelmät</i></b>	<b>16</b>
3.2.1	Sienten ITS-geenialue ja syanobakteerien tRNA Leu (UAA) - introni	16
3.2.2	DNA:n eristys	16
3.2.3	Polymeraasiketjureaktio eli PCR	17
3.2.4	Geelielektroforeesi	18
3.2.5	Sangerin sekvensointimenetelmä	18
3.2.6	Fylogeneettinen puu	18
3.2.7	Haplotyyppiverkot	19
4.	Tulokset	19
<b>4.1</b>	<b><i>Jäkälänäytteiden sieniosakkaat</i></b>	<b>19</b>
<b>4.2</b>	<b><i>Näytteiden syanobakteeriosakkaat</i></b>	<b>22</b>
<b>4.3</b>	<b><i>Syanobakteerigenotyyppien jakautuminen eri Sticta-lajien välillä</i></b>	<b>24</b>
5.	Tulosten tarkastelu	24
6.	Loppusanat	27
7.	Lähteet	27
8.	Liitteet	34

# 1. Johdanto

## 1.1 Tutkimuksen taustaa

Jäkälät ovat sieniosakkaan eli mykobiontin ja yhteyttävän osakkaan eli fotobiontin muodostamia symbiooseja, joita elää monenlaisissa maaekosysteemeissä.

Akvaattisiakin jäkäliä on, mutta ne ovat harvinaisia (Rikkinen 2002). Jäkäliä on käytetty laajasti indikaattorilajeina ympäristön tilaa koskevista tutkimuksista, sillä monet niistä ovat hyvin herkkiä elinympäristön muutoksille (Nash 2008).

Keniaasta voi löytää useimmat Itä-Afrikan maaekosysteemeistä mangrovemetsistä vuoristosademetsiin, ja sen alueella uskotaan elävän ainakin 1400 jäkälälajia.

Kuitenkin vuoteen 2011 mennessä Keniaasta oli tunnistettu vasta noin 600 jäkälälajia (Kirika ym. 2012). Afrikan jäkälälajisto tunnetaan yleensäkin ottaen verrattain huonosti. DNA-menetelmien käyttöönoton jälkeen erityisesti trooppisilta alueilta on kuvattu runsaasti uusia jäkälälajeja (Lücking ym. 2017, Lumbsch ym. 2011).

Oletetaan, että jäkälälajistoltaan rikkaimmat alueet Afrikassa sijaitsevat Länsi-Afrikan alankosademetsissä sekä Itä-Afrikan vuoristosademetsissä (Lücking 2002).

Taitavuorilla esiintyviä *Sticta*-suvun jäkäliä tai niiden fotobiontteja ei ole tätä ennen tutkittu juuri lainkaan, vaikka alueen muuta eliölajistoa on muuten tutkittu melko paljon viime aikoina (Wilder ym. 1998, Malonza ym. 2010, Brooks ym. 1998).

Tarkoituksenani onkin tässä tutkimuksessa tuottaa näytteiden mikroskopiointiin ja DNA-analyysiin perustuva selvitys Taitavuorten *Sticta*-lajeista. Lisäksi selvitän löydetyissä *Sticta*-lajeissa esiintyvien syanobakteerisymbionttien monimuotoisuutta.

Käytän tutkimuksen aineistona yhteensä 176 Taitavuorilta ja Kasigau-vuorelta vuosina 2009-2017 kerättyä *Sticta*-näytettä. Alustava lajinmääritys tapahtuu mikroskopoimalla näytteitä ja tutkimalla niiden morfologisia tuntomerkkejä. Tämän lisäksi useista kymmenistä näytteistä sekvensoidaan sieniosakkaan ITS-geenialue ja niitä verrataan geenipankissa (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) oleviin *Sticta*-sekvensseihin. Myös jäkälänäytteissä esiintyvät syanobakteerit tunnistetaan DNA-

menetelmien avulla ja syanobionttien monimuotoisuutta ja esiintymistä eri jäkälissä kartoitetaan haplotyyppiverkon avulla.

## **1.2 Tutkimusalue**

### **1.2.1 Tutkimusalueen sijainti**

Kenian kaakkoisosassa, itäisten Kaarivuorten pohjoispäässä sijaitsevien Taitavuorten ( $3^{\circ}25'S$ ,  $38^{\circ}20'E$ ) eliölajistoon kuuluu poikkeuksellisen paljon endeemisiä lajeja (Wilder ym. 1998, Malonza ym. 2010, Brooks ym. 1998, Lange 2006, Rogo & Ouge 2000). Taitavuorten alueella on useita erillisiä ylänköalueita, mm. Dabida, Sagala ja Mt. Kasigau (Kuvat 1–3). Kasigauvuori sijaitsee n. 50 km päässä muista Taitavuorista. Jäkälänäytteitä kerättiin myös Maktaun kukkulalta, joka on Taitavuorilta länteen sijaitseva kukkula sekä Elgonvuorelta, joka on Kenian ja Ugandan rajalla Länsi-Keniassa sijaitseva sammunut tulivuori. Elgonvuori otettiin mukaan, jotta Taitavuorilta saatuja tuloksia voidaan verrata johonkin muuhun itäafrikkalaiseen vuoristoalueeseen.

Ihmisen toiminnasta johtuvat elinympäristön muutokset uhkaavat Taitavuorten eliölajistoa. Nykyään Taitavuorten ylärinteillä on jäljellä enää muutama erillinen metsäsaareke, vaikka kaikesta päätellen vuorten ylärinteet ovat ennen olleet kauttaaltaan tiheän vuoristosademetsän peitossa (Pellikka 2005). Suurimmat jäljellä olevat metsäsaarekkeet ovat Mbololo (220 ha), Ngangao (120 ha) ja Chawia (50 ha) (Beentje 1988, Bytebier 2001, Burgess ym. 2006, Rogo & Ouge 2000). Viimeksi kuluneen 200 vuoden aikana metsäalueen on arvioitu pienentyneen jopa 90 % (Lovett & Wasser 1993).



Kuva 1. Kenian kartta, johon on merkitty Taita-Tavetan piirikunta, jonka alueella Taitavuoret ja Mt. Kasigau sijaitsevat. Myös Elgonvuoren sijainti on merkitty näykyviin. Karttapohja: Yangu 2015.

### 1.2.2 Ilmasto

Taitavuorten ilmastoon vaikuttavat voimakkaasti kaakkoisja koillispasaatituulet, sekä vuorten sijainti intertrooppisella konvergenssivyöhykkeellä. Tuulet vaikuttavat myös alueen sateisiin tuoden Intian valtamereltä kosteaa ilmaa. Sateet sijoittuvat kahdelle sadekaudelle; pitkä sadekausi kestää maaliskuusta toukokuuhun, ja lyhyt sadekausi lokakuusta joulukuuhun (Pellikka 2005). Taitavuorten ja Kasigauvuoren ylärinteillä esiintyy orografisia sateita ja sumuja muulloinkin kun sadekausien aikana, joten voidaan sanoa, ettei lakirinteillä ole varsinaista kuivaa kautta. Vuoden keskilämpötila tasangolla on noin 25° C, Taitavuorilla noin 12-17 °C (Pellikka 2005).

### 1.2.3 Kasvillisuus

Tropiikin vuorten metsäkasvillisuus on jakautunut voimakkaasti vyöhykkeisiin, ilman lämpötilan muuttuessa korkeuden myötä. Orografiset sateet sekä monsuunisateet vaikuttavat myös vahvasti vyöhykkeisyyteen. Itä-Afrikan matalien vuorien alarinteillä kasvaa yleensä pensassavannia sekä kuivaa puoliavointa tyräkkimetsää. Ylöspäin mentäessä kasvillisuus muuttuu ensin kuiviksi vuoristometsiksi ja sitten submontaaniseksi vuoristometsäksi ja alamontaaniseksi metsäksi, jotka vaihettuvat ylempänä kanervavyöhykkeeksi ja vuoristoniityiksi, kunnes noin 5000 metrin korkeudessa kasvillisuutta ei enää ole (Pellikka 2005, Niemelä 2011).

Kasvimaantieteellisesti vyöhykkeitä tutkitaan bioklimaattisina ja fysionomisina vyöhykkeinä. Bioklimaattisten vyöhykkeiden ajatellaan aiheutuvan suoraan ilmaston lämpötilojen eroista. Esimerkiksi tropiikissa sijaitsevan vuoren huippu ei tämän ajattelutavan mukaan edusta trooppista, vaan arktista ilmastoa keskilämpötilan perusteella. Fysionomisesta näkökulmasta katsoen vyöhykkeet määräytyvät kasvipeitteen ja elomuotojen perusteella eli tropiikissa sijaitseva vuori edustaa trooppista aluetta – vaikka korkeimmat vyöhykkeet ovat kylmiä, ne edustavat niin sanottua ”kylmää tropiikkia”. (Niemelä, 2011)

Alamontaanisten metsien kosteista tyypeistä käytetään myös nimitystä vuoristosademetsät, sillä puusto on samankaltaista kuin alankosademetsissä. Taitavuorten ja Kasigauvuoren vuoristosademetsissä on runsaasti kotoperäisiä eli endeemisiä lajeja eristyneen sijainnin ansiosta (Rikkinen 2015). Myös jäkälät hyötyvät metsän kosteudesta ja kasvavat runsaina vuoristometsien puiden sammaloituneilla tyvillä ja rungoilla sekä kivien ja kallion kosteimmissa kohdissa. (Niemelä 2011).





Kuva 2 A. vuoristosademetsää Kasigauvuoren ylärinteellä. B. Näkymä Kasigauvuoren huipulta Tsavo East-kansallispuistoon.



Kuva 3. Tyytyväisiä kenttäkurssilaisia Kasigauvuoren sivuhuipulla tammikuussa 2019.

## 2. Jäkälät

Jäkälät ovat sieniosakkaan eli mykobiontin ja yhteyttävän osakkaan eli fotobiontin muodostamia symbiooseja, joita elää erityisesti maaekosysteemeissä. Jäkälän fotobionttina voi olla joko viherlevä tai syanobakteeri tai joissakin tapauksissa molemmat (Nash 1996). Ennen 1900-luvun alkua jäkälät miellettiin yhdeksi eliöksi, kunnes ymmärrettiin, että kyse on vähintään kahdesta eri osakkaasta muodostuvasta symbioosista. Jäkäläsienet kuuluvat joko kotelosieniin (Ascomycota) tai harvoin kantasieniin (Basidiomycota) ja useimmat viherleväfotobiontit sukuihin *Coccomyxa*, *Trebouxia* ja *Trentepohlia*. Jäkälä, joilla on fotobionttinaan syanobakteeri, kutsutaan syanojäkäliksi. Syanojäkäliden osuudeksi jäkäläsymbiooseista arvellaan noin 10 % (Rikkinen 2002).

Jäkälät jaetaan kasvutapansa perusteella rupi-, lehti ja pensasjäkälisiin. Rupijäkälä on eniten, ja niiden sekovarren rakenne on hyvin vaihteleva, nimensä mukaisesti rupimainen. Lehtijäkäliden sekovarsi on liuskainen ja lehtimäinen, ja niiden ylä- ja alapinta ovat selkeästi erilaiset; esimerkiksi *Sticta*-suvun jäkälillä yläpinta on usein ruskean sävyinen ja isidinen, alapuoli huokosellinen ja usein vaaleampi. Pensasjäkäliden liuskat ovat taas litteitä tai liereitä. Sekovarsi kehittyy sienija levä- tai bakteeriosakkaan vuorovaikutuksessa, joten voidaan erottaa piirteitä, jotka ovat ominaisia vain jäkälöityneille sienille. Tällaisia ominaisuuksia ovat esimerkiksi isidiot, pikkuliuskat sekä hengityshuokokset eli kyfellit. Uloin sekovarren kerros muodostuu sienirihmaston soluista, ja se suojaaa sen alla olevaa sienirihmastoja sekä fotobiontteja. (Rikkinen 2002)

Jäkälä on kuvattu tähän mennessä noin 18 500 lajia, jotka kasvavat erilaisilla kasvualustoilla, usein maalla, puiden rungoilla tai kivipinnalla (Feuerer & Hawksworth 2007). Trooppiset jäkälät kasvavat usein myös esimerkiksi puiden lehdillä. Joillain jäkälillä, erityisesti lehtijäkälillä, on niin sanottuja juurtumahapsia eli ritsoideja, joilla ne kiinnittyvät kasvualustansa (Jahns 1988). Jäkälillä on suuri rooli monissa ekosysteemeissä, esimerkiksi mineraalien ja kiven biomekaanisen hajotuksen muodostaessa uutta maaperää. Ihmisen toiminnan seurauksena monet jäkälälajit ovat kuitenkin vaarantuneet. Jotkut jäkälät ovatkin hyviä indikaattorilajeja, sillä ne

vastaavat herkästi ympäristön muutoksiin, kuten esimerkiksi ilmansaasteisiin (Nash 1996)

## 2.1 Jäkälien lisääntyminen

Jäkälät voivat lisääntyä sekä suvuttomasti että suvullisesti. Jäkälän sieniosakkaat voivat lisääntyä suvullisesti tuottamalla itiöitä. Suvuton lisääntyminen on kuitenkin usein nopeampaa ja tehokkaampaa, joten monet jäkälät tuottavat runsaasti suvuttomia symbioottisia leviäimiä. Symbioottiset leviäimet sisältävät sekä sieniosakkaan että fotobionttisoluja. Esimerkiksi jäkälämurut eli solediot voivat levitä eläinten ja tuulen mukana. Jäkälät voivat lisääntyä myös isidioiden avulla, jotka ovat hieman soledioita suurempia leviäimiä. Myös rikkoutuneen jäkäläsekoarren kappaleista voi kasvaa uusia jäkäläyksilöitä (Nash 2008)

## 2.2 Syanojäkälät ja *Nostoc*-suku

Syanojäkäläksi kutsutaan jäkälää, joiden fotobionttina on syanobakteeri eli syanobiontti. Arviolta 1700 jäkäläsienilajia, lähes poikkeuksetta kotelosieniä (Ascomycota), elää symbioosissa eri syanobakteerien kanssa eli noin 10 prosentilla kaikista jäkälöityneistä sienistä on fotobionttinaan syanobakteeri (Ahmadjian 1993, Rikkinen 2002). Yleisiä syanobakteerifotobionttisukuja ovat esimerkiksi *Nostoc* ja *Rhizonema*. *Sticta*-suvun jäkälän fotobiontit ovat *Nostoc*-suvun syanobakteereja. Yhteyttämisen lisäksi syanobakteerit sitovat myös ilman typpeä. Joillain jäkälillä esiintyy sekoarren erikoistuneita rakenteita, kefalodioita, joissa syanobakteerit sijaitsevat ja sitovat typpeä – tällöin ensisijainen fotobiontti on viherlevä, joka elää muualla sekoarressa. (Rikkinen 2002)

Syanojäkälät eivät siis ole systemaattisesti tai rakenteellisesti yhtenäinen ryhmä. Kuitenkin, syanobakteeri fotobionttina tarvitsee nestemäistä vettä yhteyttämiseen, ja siksi syanojäkälät viihtyvätkin paikoissa, joissa ilman kosteus on korkea ja valoa on riittävästi (Rikkinen 2002, 2007). Syanojäkälät voidaan jakaa kaksibionttisiin ja kolmebionttisiin jäkäliin. Kaksibionttisissa jäkälissä on sieniosakkaan lisäksi yksi syanobakteeriosakas. Kolmebionttisissa symbiooseissa on mykobiontin lisäksi syanobakteeri ja viherlevä. Kolmebionttiset syanojäkälät muodostavat sekoarren



sisälle tai pinnalle usein kefalodioita, joissa syanobiontit elävät; tällöin viherleväosakkaat sijaitsevat useimmiten jäkälän sekovarren kuorikerroksen alla omana fotobionttikerroksenaan. Kefalodioita muodostavia syanojäkälää tunnetaan noin viisisataa, esimerkiksi *Sticta*-suvun lajeja, keuhkojäkälää (*Lobaria*), nahkajäkälää (*Peltigera*) ja munuaisjäkälää (*Nephroma*). Kolmebionttisissa jäkälissä syanobakteerien päätehtävänä on usein typensidonta, ja viherleväosakas puolestaan yhteyttää. Kaksibionttisissa syanojäkälissä syanobakteerit sekä yhteyttävät että sitovat typpeä. (Rikkinen 2002)

Jotkut kefalodiolliset jäkälät voivat lisäksi muodostaa myös kaksibionttisen symbioosin pelkän syanobiontin kanssa, jolloin sekovarsi on usein hyvin erinäköinen kuin kolmebionttisella jäkälällä. Tällaisia jäkälää kutsutaan fotosymbiodeemeiksi (Kuva 8). Jäkälän sekovarren morfologia voi olla erilainen, riippuen jäkälän ensisijaisesta, yhteyttävästä fotobiontista. Näillä morfotyypeillä, syanomorfilla (cyanomorph) ja viherlevämorfilla (chloromorph) voi olla yhtenäinen sekovarsi, tai ne voivat elää erillään. Usein ne kuitenkin elävät yhdessä esimerkiksi päällekkäin (Moncada ym. 2013, Rikkinen 2002).



Kuva 4. Fotosymbiodeemisen nahkajäkälän (*Peltigera britannica*) yhdessä elävät morfotyytit. (Kuva: Wanderflechten)

Useimmat syanojäkälät voi helposti sijoittaa yhteen kolmesta pääkasvutypistä, joko rupijäkäliin, lehtijäkäliin tai pensasjäkäliin (Kuva 8). Poikkeuksiakin on, esimerkiksi *Dictyonema*-suvun lajit, joilla sekovartena toimii muuntunut kääväkkään itiöemä. *Dictyonema*-suvun jäkäläsienet ovat kantasieniä (Basidiomyceta), eivätkä kotelosieniä (Ascomycota), kuten suurin osa jäkäläsienistä (Rikkinen 2002). Useimmat syanojäkälät ovat tyypillisiä lehtijäkäliä. Jotkut jäkälät sijoittuvat lehtijäkäliden ja rupijäkäliden välimaastoon, kuten esimerkiksi *Psoroma*-suvun useat suomumaiset lajit (Rikkinen 2002). Pensasmaisia syanojäkäliä ei ole kovin paljon, niihin kuuluvat esimerkiksi joidenkin fotosymbiodeemisten *Sticta*-lajien syanomuo-dot.



Kuva 5. Jäkäliden kasvutypit. A. Pensasjäkälä. B. Rupijäkälä. C. Lehtijäkälä. (Kuvat: Inkydigit & Siaronj)

Syanobakteerit on ikivanha ja hyvin monimuotoinen yhteyttämiseen kykenevä prokaryoottiryhmä (Rai ym. 2000). *Nostoc*-suvun syanobakteerit ovat yleisimpiä syanojäkälälien, erityisesti maljajäkälälien (Lecanorales), syanobiontteja. *Nostoc*-suvun syanobakteerit muodostavat symbiooseja myös muiden eliöryhmien kanssa, kuten esimerkiksi joidenkin sarvisammalten kanssa (Anthoceroophyta) (Rikkinen 2007, 2017). *Nostoc*-suvun syanobakteerit ovat tunnettuja siitä, että ne voivat muodostaa sienien kanssa erilaisia jäkäläsymbiooseja. Ne voivat toimia sienien hiilen ja typen lähteinä kaksibionttisissa jäkälissä tai pelkän typen lähteinä monibionttisissa jäkäläsymbiooseissa (Rikkinen 2002). *Nostoc*-syanoobiontteja voidaan tunnistaa käyttämällä geenimarkkerina esimerkiksi tRNA Leu (UAA) intronia (trnL), joka oli ensimmäinen bakteereista sekvensoitu introni (Rikkinen 2002, Paulsrud & Lindblad 1998).

### 2.3 *Sticta*-suvun syanojäkälät

*Sticta*-suvun jäkälät (Kuva 6A) ovat syanojäkäläitä, jotka kuuluvat kasvutyyppiltään lehtijäkäläiin. Joillakin suvun lajeilla nähdään myös pensasjäkälämäisiä sekovarren rakenteita. Ne kuuluvat kotelosienten Peltigerales-lahkoon, jonka jäsenet ovat kaikki syanojäkäläitä. *Sticta*-sukuun kuuluvia lajeja on tähän mennessä tunnistettu noin 200, mutta määrän arvellaan todellisuudessa olevan suurempi – se saattaakin olla yksi suurimmista makrojäkäläsuvuista (Moncada ym. 2013). *Sticta*-lajien syanobionttina on ilmeisesti aina *Nostoc*-suvun syanobakteeri. Suvussa on myös useita kolmebionttisia lajeja, joiden yhteyttävä osakas on viherlevä, ja joiden syanobakteerit ovat kefalodioissa. Useat niistä voivat myös muodostaa fotosymbiodeemeja (Moncada ym. 2013). *Sticta*-suvulle ominainen rakennepiirre ovat lehtimäisen sekovarren alapinnalla esiintyvät suuret hengityshuokokset eli kyfellit (Kuva 6B) (Jayalal ym. 2014).





Kuva 6A. *Sticta* cf. *weigeli* Ngangaon metsässä Taitavuorilla 9.1.2019. 6B. Kysellejä *Sticta*-suvun jäkälän alapinnalla. (Kuva: Pella) (Kuva: Pella)

### 3. Aineisto ja menetelmät

#### 3.1 Näyteaineisto ja keruupaikat

Tässä tutkimuksessa tarkastellut jäkälänäytteet kerättiin vuosien 2009–2017 aikana Taitavuorten alueelta ja Elgonvuoren rinteeltä. Aineistosta valittiin ensin 176 jäkälänäytettä, joita tarkasteltiin mikroskooppisesti, tavoitteena oppia tunnistamaan kullekin *Sticta*-suvun lajille tyypillisiä piirteitä. Lisäksi 48 *Sticta*-näytteestä sekvensoitiin sieniosakkaan ITS-geenialue sekä syanobakteeriosakkaan trnL geenialue. Tutkittujen näytteiden tiedot löytyvät Liitteestä 1.

## 3.2 DNA-menetelmät

### 3.2.1 Sienten ITS-geenialue ja syanobakteerien tRNA Leu (UAA) -introni

Tässä tutkimuksessa selvitettiin kunkin jäkälänäytteen sieniosakkaan ITS (internal transcribed spacer) -geenialueen emäsjärjestys, jota käytetään sienisystematiikassa laajasti DNA-viivakoodialueena (Schoch ym. 2012). Yleensä erittäin vaihtelevat ITS I ja ITS II alueet, sekä pysyvämpi, ITS-alueita yhdistävä 5.8S-alue sijaitsevat sienisolun tuman ribosomaalisessa DNA:ssa alueiden 18S (SSU) ja 28S (LSU) välissä. Schoch ym. (2012) vertasi tutkimusryhmänsä tutkimuksessa sienten eri geenialueiden suoriutumista PCR:ssä, tavoitteena löytää toimiva DNA-viivakoodi suurelle joukolle sieniä, jota voidaan hyödyntää sienten fylogeneettisessä tutkimuksessa. Tutkimuksessa vertailtiin ITS, LSU ja SSU-alueita, ja yhtä proteiinia koodaavaa RPB1-aluetta. Tutkimustuloksena selvisi, että ITS-alueiden monistaminen on helpointa ja tehokkainta pienestäkin DNAmäärästä. (Schoch ym. 2012)

*Nostoc*-syanobiontteja tunnistetaan yleisesti käyttämällä geenimarkkerina tRNA Leu (UAA) intronia (trnL). Intronin arvellaan olevan hyvin vanhaa alkuperää. Tätä tyyppin I intronia esiintyy suurimmalla osalla syanobakteereista sekä myös esimerkiksi useiden viherlevien plastideista. (Costa ym. 2002, Rikkinen 2004)

### 3.2.2 DNA:n eristys

Eristin DNA:n Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification kit:illä, joka on suunniteltu nopeaan DNA:n eristykseen eläin-, bakteeritai sienisolusta. DNA-molekyyli eristetään soluista ensin rikkomalla solun rakenne, jolloin DNA vapautuu solun tumasta. Vapautunut DNA kerätään piidioksidipohjaiseen suodattimeen, josta se eluioidaan irti puhdistusvaiheiden jälkeen. (thermofisherscientific.com).

Otin jäkälänäytteistä pienet palaset eppendorf-putkiin DNA-uuttoa varten.

Ensimmäiseksi hienonsin jäkäläpalat kussakin putkessa muovisilla nuijilla. DNA-eristykset tehtiin Thermo scientific geneJet Genomic DNA Purification kitillä.

Ohjeena käytin Gram-negatiivisille bakteereille tarkoitettua protokollaa.



### 3.2.3 Polymeraasiketjureaktio eli PCR

PCR eli polymeraasiketjureaktiolla voidaan monistaa erittäin pieniä määriä DNA:ta miljooniksi kopioksi. Haluttujen geenialueiden löytämiseen tarvitaan alukkeet, jotka liittyvät spesifisesti haluttuihin geenialueisiin. Alukkeet aloittavat monistettavan alueen, ja DNA-polymeraasientsyymi liittämää yksittäisiä dNTP-molekyylejä templaatti-DNA:han emäsparisäännön mukaisesti. Alukkeet, DNA-polymeraasientsyymi sekä dNTP-molekyylit ovat ns. mastermix-lioksessa, jota pipetoidaan monistettaviin näytteisiin. Mastermix-liuoksessa käytetään myös puskuriliuosta, joka stabiloi polymeraasientsyymin toimintaa. (Jones ym. 2016)

Mastermix-liuos ja monistettava templaatti-DNA pipetoitiin PCR-putkiin, ja asetettiin PCR-laitteeseen. PCR-laite muuttaa lämpötilaa halutun lämpösyklin mukaisesti. Ensimmäisessä lämpösyklin vaiheessa eli denaturaatiovaiheessa reaktioseos kuumennetaan noin 94-98 asteeseen yleensä noin 30-60 sekunnin ajaksi, jolloin templaatti-DNA:n vastinjuosteet erottuvat toisistaan. Seuraavassa vaiheessa PCR-laite laskee lämpötilan noin 45-65 asteeseen, ja alukkeet kiinnittyvät monistettaviin geenialueisiin yksijuosteiseen DNA:han emäsparisäännön mukaisesti. Ekstensiovaiheessa eli ns. pidentymisvaiheessa DNA-polymeraasi luo vastinjuostetta yksijuosteiselle templaatti-DNA:lle noin 72 asteen lämpötilassa. Ekstensiovaiheen pituus riippuu siitä, kuinka paljon PCR-tuotetta halutaan. Yleensä sykliä toistetaan noin 25-45 kertaa. Noin kymmenen minuutin loppuvaihe 72 asteessa varmistaa sen, etteivät DNA-kopiot jää kesken. (Jones ym. 2016)

Eristyksien jälkeen monistin kustakin DNA-näytteestä PCR:llä sieniosakkaan ITS-geenialueen (Kuva 18) ja syanobakteeriosakkaan trnL-geenialueen. Ensimmäisten DNA-uuottojen onnistumista testattiin monistamalla myös syanobakteerin rbcLX-geenialue. ITS-alueen monistamisessa ja sekvensoinnissa käytettiin alukkeina ITS1F (5'tccgtaggtgaacctgcgg-3') ja ITS4R (5'-tcctccgcttattgatatgc-3') (White ym. 1990). TrnL-alueen monistamiseen käytettiin alukkeina t-RNA<sub>Leu\_out1</sub> (5'-ggaattcGGGGRTRTGGYGRAAT-3') ja t-RNA<sub>Leu\_out2</sub> (5'-tcccGGGGRYRGRGGGACTT-3') (Paulsrud & Lindblad 1998) ja sekvensointiin alukkeesta t-RNA<sub>Leu\_in1</sub> (Paulsrud & Lindblad 1998) muokattua aluketta trnL\_UFII (5'-GGTAGACGCTACGGACTT-3'). PCR-

entsyyminä käytettiin Dynazyme II -entsyymiä (Finnzymes/ThermoFisherScientific). Monistamisessa käytetyt lämpösyklit on esitetty Liitteessä 2.

### 3.2.4 Geelielektroforeesi

PCR:n onnistuminen varmistettiin geelielektroforeesiajolla. Geelielektroforeesi perustuu geelille pipetoitujen sähkövarautuneiden komponenttien, tässä tapauksessa nukleiinihappojen, liikkeeseen ja siten erottelamiseen sähkökentällä. Biomolekyylit eroavat toisistaan sähkökentällä koon, varauksen tai muodon perusteella, riippuen elektroforeesiajon olosuhteista ja tarkoituksesta. Tässä tutkimuksessa käytettiin agarosigeeliä, jota käytetään DNA ja RNA-molekyylien erottelamiseen niiden koon perusteella. Tulokset voidaan katsoa UV-kameralla, jolloin värjätyt näytteet erottuvat geelillä selvästi. (Jones ym. 2016). Tässä työssä käytin 1,5g agarosia ja 80 ml TBE-puskuria. Elektroforeesia ajettiin 25 minuuttia. Geeliä katsottiin UV-kameralla.

### 3.2.5 Sangerin sekvensointimenetelmä

Kunkin näytteen PCR-tuotteet sekvensoitiin Sanger-menetelmällä GATC Biotech yrityksen toimesta Saksassa. Sanger-menetelmä, on kehittäjänsä mukaan nimetty yleisesti käytetty sekvensointimenetelmä, jonka avulla selvitetään DNA:n emäsjärjestys. Sekvensoitavat DNA-pätkät aukaistaan ensin yksijuosteisiksi, ja niihin liitetään alukkeet. Alukkeet merkitään fluoresoivasti tai radioaktiivisesti. DNA-pätkät asetetaan ensin neljään koeputkeen, jossa on DNA-polymeraasientsyymiä, sekä yksittäisiä nukleotideja ja dideoksinukleotideja. Dideoksinukleotidit pysäyttävät DNA:n replikaation kussakin koeputkessa sen sisältämän dideoksinukleotidin kohdalta. Näin saadaan eripituisia sekvenssejä, jotka erotellaan geelielektroforeesilla. Erottelun jälkeen fragmenteista saadaan selville emäsjärjestys. (Alberts ym. 2016)

### 3.2.6 Fylogeneettinen puu

Fylogeneettinen puu, jota kutsutaan myös evoluutiopuuksi, on eliöryhmän polveutumisjärjestystä eli fylogeniaa kuvaava kaavio. Fylogeneettistä puuta kutsutaan puuksi, koska se on ikään kuin juuresta haarautuva, puumainen kaavio. Kaavion haarat edustavat eri lajien kehityslinjoja. Fylogeneettisen puun avulla

voidaan esittää samasta kantamuodosta polveutuvien taksonien välinen polveutumisjärjestys.

Sekvenssit linjattiin Codon code aligner -linjausohjelmalla (CodonCode Corporation, MA, USA). ITS-sekvensseistä luotiin fylogeneettinen puu Bayesian-menetelmällä (Huelsenbeck & Ronquist 2001), Mr.Bayes-ohjelmalla (<http://nbisweden.github.io/MrBayes/index.html>) ohjaajani Ulla Kaasalaisen toimesta. Puussa esitetyt sekvenssit ovat pääosin geenipankista, mutta osa on myös julkaisemattomia sekvenssejä.

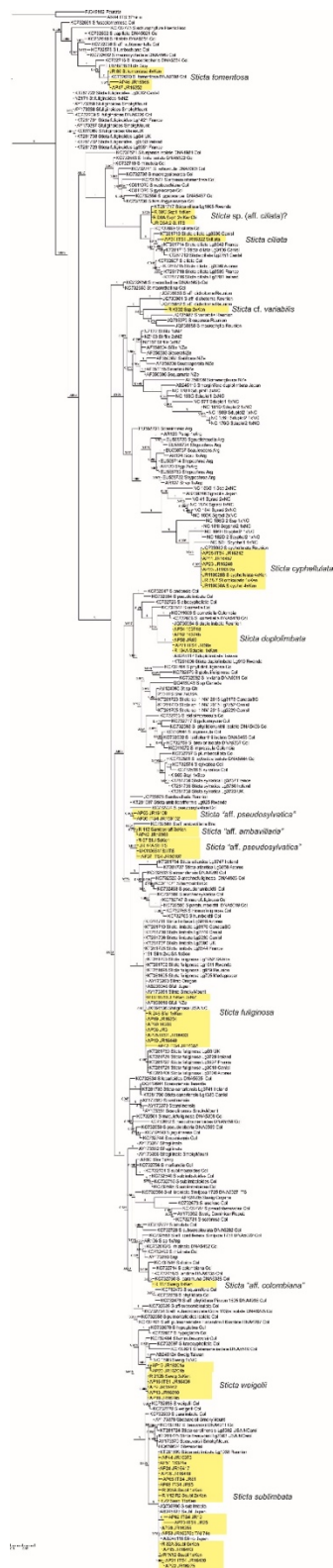
### 3.2.7 Haplotyyppiverkot

Haplotyyppiverkkojen avulla kuvataan erilaisten haploidisten genotyyppien sekvenssien assosiaatiota keskenään (Teacher & Griffiths 2010). Syanobakteerien trnL-sekvensseistä luotiin haplotyyppiverkko Network-ohjelmalla (<https://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>), jonka avulla voidaan havainnollistaa esimerkiksi eri syanobakteerigenotyyppien esiintyminen eri *Sticta*-lajien sekovarsissa.

## 4. Tulokset

### 4.1 Jäkälänäytteiden sieniosakkaat

DNA-tutkimusten kohteeksi valitut 48 *Sticta*-näytettä jakautuivat sieniosakkaan ITS-sekvenssien perusteella 11 eri ryhmään. Geenipankista löytyneiden samankaltaisten sekvenssien perusteella useimmat niistä näyttivät edustavan aiemmin tunnettuja *Sticta*-lajeja (Kuva 7).



Kuva 7. Osa sieniosakkaan ITS-sekvensseihin perustuvasta fylogeneettisestä puusta. Tässä työssä analysoidut, Keniasta kerätyt näytteet on merkitty keltaisella.

Yhteensä kuusi Vurian etelärinteeltä kerättyä näytettä kuuluu ilmeisesti lajiin *Sticta tomentosa*, koska ne ryhmittyvät puussa yhteen Kolumbiasta aiemmin kerättyyn

tämän lajin näytteen kanssa (Kuva 7). Kenialaiset *Sticta ciliata* -näytteet puolestaan jakautuivat puussa kahteen ryhmään (Kuva 7). Kolme Ngangaon metsästä kerättyä näytettä ryhmittyvät yhteen aiemmin Rwandasta kerätyn näytteen kanssa, mutta yksi näyte on läheisempää sukua aiemmin Azoreilta ja Kolumbiasta kerättyille näytteille. Kaksi Kasigauvuorelta kerättyä kolmebionttista *Sticta*-näytettä ryhmittyy yhteen useiden Réunion-saarelta aiemmin kerättyjen, niin ikään kolmebionttisten *Sticta*-näytteiden kanssa (Kuva 7).

Kaikki Sagallan luonnonmetsästä ja Mbolololta kerättyä näytettä ryhmittyvät aiemmin Réunionin saarelta kerätyn *Sticta cyphellulata* -näytteen kanssa (Kuva 7). Neljä Vurialta kerättyä näytettä ryhmittyvät puolestaan yhteen aiemmin Réunionilta, Taiwanista ja Ruandasta kerättyjen *Sticta duplolimata* -näytteiden kanssa (Kuva 7).

Viisitoista Vurialta, Sagallan luonnonmetsästä sekä Mwachorasta kerättyä näytettä kuuluvat mitä ilmeisimmin lajiin *Sticta fuliginosa* (Kuva 7). Ne ryhmittyvät yhteen yhdeksän Etelä-Afrikasta, Ruandasta, Réunionilta, Madagaskarilta, Yhdysvalloista, Japanista ja Uudesta-Seelannista kerätyn näytteen kanssa.

Neljä Vurialta kerättyä näytettä ovat ilmeisesti suhteellisen läheistä sukua lajille *Sticta ambavillaria*, mutta eivät kuitenkaan lukeudu kyseiseen lajiin (Kuva 7). Elgonvuorelta kerätyt näytteet ovat puolestaan suhteellisen läheistä sukua lajille *Sticta pseudosylvatica*, ja ryhmittyvät kahteen eri ryhmään fylogeneettisessa puussa.

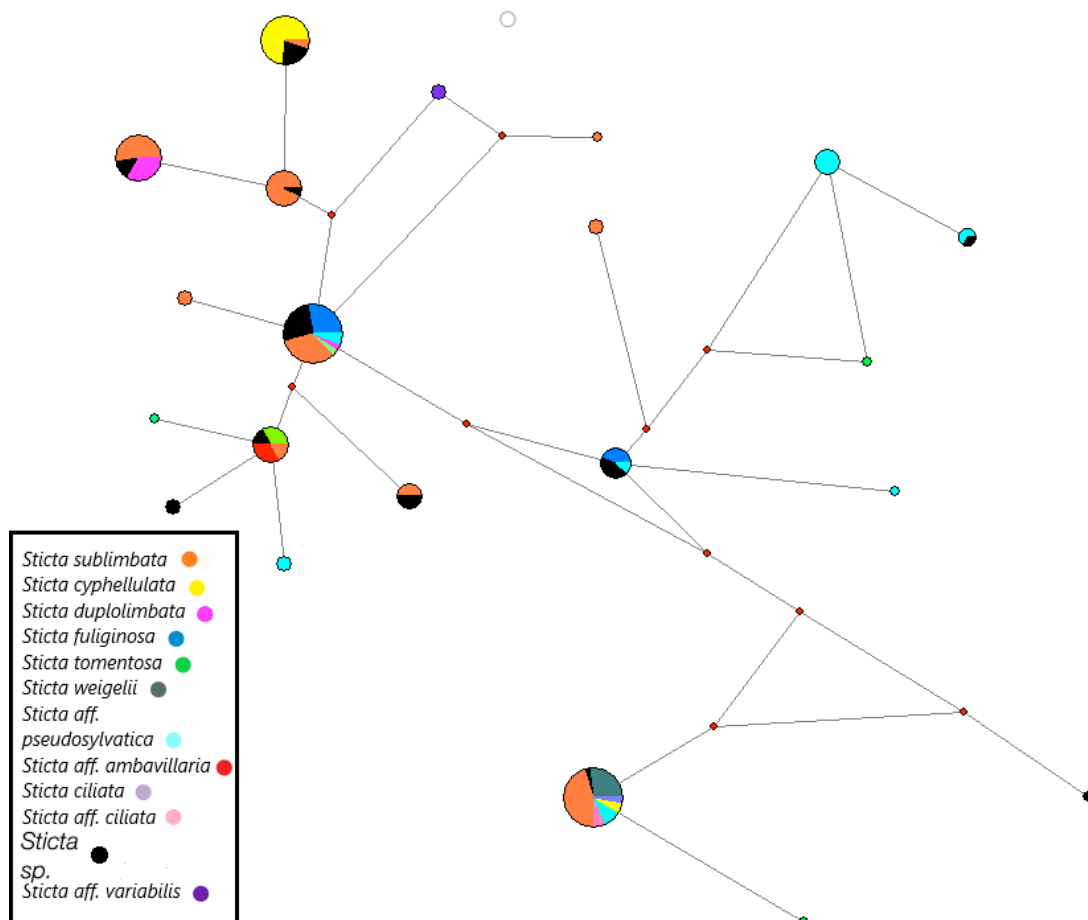
Monet Sagallan ja Fururun luonnonmetsistä kerätyt näytteet sekä kolme Yalevuoren huipulta kerättyä näytettä kuuluvat aivan ilmeisesti lajiin *Sticta weigeli*, joka on kuitenkin sisäisesti monimuotoinen (Kuva 7).

Yksi Vurialta kerätty näyte, on *Sticta colombiana* -lajin kaltainen laji, mikä ryhmittyy yhteen neljän Kolumbiasta kerätyn näytteen kanssa.

Aineiston yleisin *Sticta*-laji on *Sticta sublimbata*, jota edustavat näytteet. Näytteet ryhmittyvät neljään eri ryhmään, joihin kuuluu myös Japanista ja Reunion-saarelta kerättyjä näytteitä.

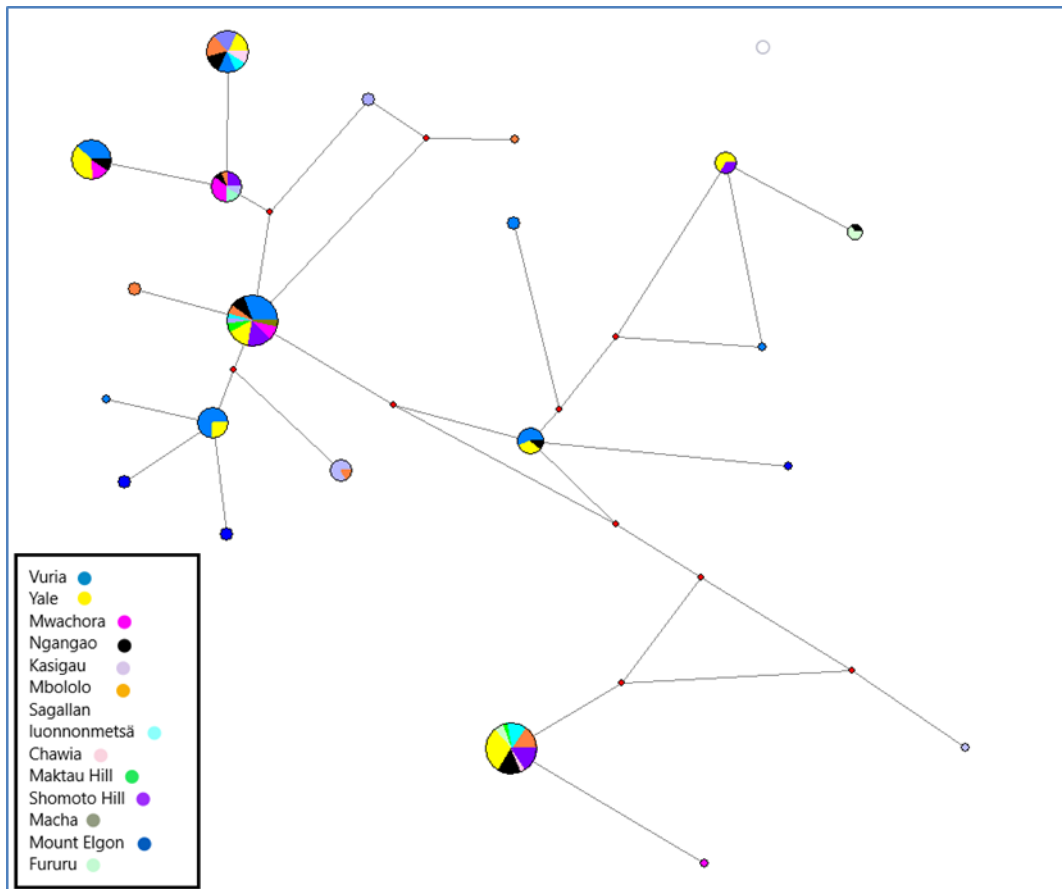
## 4.2 Näytteiden syanobakteeriosakkaat

*Sticta*-näytteiden syanobakteeriosakkaista saadut TrnL-sekvenssit kertoivat, että tukituissa jäkälissä esiintyi yhteensä 21 syanobakteerigenotyyppiä, jota kaikki kuuluivat sukuun *Nostoc*. Kustakin jäkälänäytteestä löydettiin aina vain yksi *Nostoc*-genotyyppi. Aineiston perusteella luotiin sekvenssien emäsjärjestyksen samankaltaisuutta kuvaavia haplotyyppiverkkoja, jotka näyttävät kunkin *Nostoc*-genotyypin esiintymisen eri *Sticta*-lajeissa (Kuva 8) ja eri metsissä (Kuva 9). Kolmestakymmeestä *Sticta*-näytteestä ei saatu ITS-sekvenssiä, ja nämä näytteet esiintyvät haplotyyppiverkossa nimellä *Sticta sp.* (Kuva 8 ja 9).



Kuva 8. *Sticta*-näytteistä tunnistettujen *Nostoc*-genotyyppien monimuotoisuus. Haplotyyppiverkossa genotyypin (pallot) koko ilmaisee kunkin *Nostoc*-

genotyyppin runsauden ja pallon värit sen missä *Sticta*-lajeissa kyseinen genotyyppi esiintyi.



Kuva 9. *Sticta*-näytteistä tunnistettujen *Nostoc*-genotyyppien esiintyminen eri metsäkohteissa. Haplotypeverkossa kutakin genotyyppiä esittävän pallon koko ilmaisee kyseisen *Nostoc*-genotyyppin runsauden aineistossa, ja pallon värit sen, missä metsissä kyseinen genotyyppi esiintyi.

Syanobakteerigenotyyppien merkittävää jakautumista eri keruupaikkojen mukaan ei ole havaittavissa, sillä melkein kaikkia runsaimpia genotyyppiejä löytyi useimmilta keruupaikoilta (kuva 9). Osa pienemmistä genotyyppiryhmistä, eli pienimmistä ympyröistä sisältää kuitenkin vain yhden tai muutaman keruupaikan näytteitä.

Suurin osa syanobakteerigenotyypeistä on Vurialta ja Yalelta kerätyistä näytteistä, sillä näitä keruupaikkoja kuvaavia värejä on verkossa useimmissa ja runsaimmissa, yhteensä seitsemässä genotyyppissä. Melkein kaikkien genotyyppien kohdalla ryhmässä on näytteitä sekä Yalelta, että Vurialta (Kuva 9).

Ngangaolta kerättyjen näytteiden syanobakteerigenotyypppejä löytyy seitsemän erilaista, ei kuitenkaan prosentuaalisesti niin montaa näytettä, kuin Yalelta ja Vuralta kerättyjä. Mwachoralta ja Shomoton kukkulalta kerättyjä näytteitä on myös useammassa eri genotyyppiryhmässä. Selvästi harvinaisemmat genotyypit näytteiden joukossa ovat kerätty Mbolololta, Chawialta, Fururulta, Maktaun kukkulalta ja Machalta.

#### 4.3 Syanobakteerigenotyyppien jakautuminen eri *Sticta*-lajien välillä

Haplotyyppiverkon (kuva 8) mukaan on havaittavissa selkeääkin syanobakteerigenotyyppien jakautumista *Sticta*-lajien välillä. Aineiston runsaimman *Sticta sublimbata*-lajin näytteet kuuluivat yhteensä kymmeneen eri syanobakteerigenotyyppiryhmään (kuva 8), mutta kuitenkin aineiston toiseksi runsaimpien *Sticta cyphellulata* ja *Sticta fuliginosa*-lajien näytteet jakautuvat molemmat ainoastaan kahteen genotyyppiryhmään (kuva 8). *Sticta duplolimbata*-lajin näytteet kuuluvat myös kaikki ainoastaan kahteen genotyyppiryhmään, jotka näkyvät kuvassa 8. Myös esimerkiksi *Sticta weigeli*-, *Sticta ciliata* ja *Sticta aff. ciliata*-lajien näytteet kuuluvat kaikki yhteen ja samaan genotyyppiryhmään.

## 5. Tulosten tarkastelu

Tutkimassani aineistossa oli näytteitä kaikkiaan yhdestätoista *Sticta*-suvun lajista, mikä on yllättävän paljon aineiston kokoon nähden. Koko Itä-Afrikasta on aiemmin ilmoitettu vain kymmenen *Sticta*-lajia, joista seitsemän on oletettu esiintyvän Keniassa.

*Sticta*-suvun jäkälät ovat yleisiä subtrooppisilla ja trooppisilla alueilla, mutta niitä esiintyy myös lauhkealla ilmastovyöhykkeellä (Jayalal ym. 2014). Suvun jäkälistä tehdäänkin tällä hetkellä tutkimusta ympäri maailmaa, esimerkiksi Kolumbiassa, jossa *Sticta*-suvun lajisto on todella monimuotoinen (Moncada ym. 2014). Suvun



jäkälät kasvavat havaintoni mukaan yleensä metsien avoimemmilla paikoilla, joihin pääsee auringonvaloa puuston lomasta.

Itä-Afrikasta on aiemmin ilmoitettu kymmenen *Sticta*-lajia, joista yhdellä on kaksi muotoa: *Sticta ambavillaria*, *S. cyphellulata*, *S. dichotoma*, *S. fuliginosa*, *S. limbata*, *S. orbicularis*, *S. papyraceae*, *S. sublimbata*, *S. tomentosa*, *S. weigeli* var. *weigeli* ja *S. weigeli* var. *xanthotropa*. Näistä kaikki paitsi *S. orbicularis* sekä kolmebionttiset *S. dichotoma* ja *S. papyraceae* esiintyvät Keniassa. Kolme viimeksi mainittua lajia esiintyvät jo Kenian naapurimaassa Tansaniassa. *Sticta orbicularis* on ilmoitettu Tansanian lisäksi myös Ugandasta, Réunionista ja Aasiasta, *S. dichotoma* puolestaan Mauritiukselta. (Swinscow & Krog 1988)

*Sticta ambavillaria*, *S. fuliginosa*, *S. limbata*, *S. sublimbata* ja *S. weigeli* var. *weigeli* on ilmoitettu Etiopiasta, Keniasta, Tansaniasta ja Ugandasta. Esimerkiksi *Sticta cyphellulata* esiintyy myös Australiassa ja Aasiassa (Swinscow & Krog 1988). *S. fuliginosa*, *S. limbata*, *S. sublimbata* ja *S. weigeli* ovat kaikki lajeja, joita pidettiin aiemmin laajalle levinneinä, mutta joiden on DNA-menetelmin osoitettu olevan useita lajeja sisältäviä ryhmiä (Moncada ym. 2014, Moncada ym. 2018).

Myös Taitavuorten *Sticta*-lajisto osoittautui tässä tutkimuksessa monipuoliseksi. Ennen DNA-menetelmin tuotettua lajinmäärittystä tutkin näytteeni mikroskoopin avulla, tarkoitukseni alustavasti määrittää lajit niiden morfologian perusteella. Suurin osa näytteistä muistutti lajia *Sticta sublimbata*, minkä myös sekvensointitulokset vahvistivat.

Myös *Sticta fuliginosa* on Taitavuorilla ilmeisen yleinen, tutkimassani aineistossa toiseksi yleisin laji. Se on ilmoitettu Taitavuorten lisäksi muun muassa Etelä-Koreassa, Japanissa, Madakasgarilla, Etelä-Afrikassa, Kolumbiassa sekä Yhdysvalloissa (Jayalal ym. 2018, Moncada ym. 2014).

Taitavuorilta kerätyn aineiston joukossa oli myös näytteitä, joiden lähimmiksi sukulaisiksi osoittautuivat lajit *Sticta pseudosylvatica*, *Sticta ambavillaria* ja *Sticta ciliata*.

Tämä ja moni muu seikka kertoo, että *Sticta*-suvun monimuotoisuus on tiedettyä suurempi ja lajeja on enemmän kuin on aiemmin arvioitu. Myös muut Taitavuorilta tehdyt jäkälätutkimukset ovat osoittaneet, että alueen jäkälälajien määrä on aiemmin arvioitua suurempi (Jauhiainen 2012).

Eri keruupaikoista kerättyjen näytteiden joukossa oli useampia syanobakteerigenotyypppejä. Ainoastaan muutamista paikoista, kuten Fururulta, Machalta ja Chawialta kerätyt näytteet kuuluivat vain yhteen tai kahteen genotyyppiin (Kuva 9). Näistä kyseisistä paikoista kerättyjä näytteitä oli kuitenkin selvästi vähemmän, kuin esimerkiksi Vurialta ja Yalelta kerättyjä näytteitä, joten selkeää johtopäätöstä genotyyppien jakautumisesta ei voida tehdä.

Toisessa haplotyyppiverkossa (kuva 8) tarkasteltiin *Sticta*-suvun sienilajien jakautumista eri syanobakteerigenotyyppien välillä. Tässä jaottelussa voitiin huomata selkeämpää jakautumista, sillä useat sienilajit omasivat aina tietyn genotyypin fotobiontin. Esimerkiksi *Sticta fuliginosa* ja *Sticta cyphellulata* kuuluivat molemmat ainoastaan kahteen genotyyppiin. Kuitenkin aineiston runsaimman lajin *Sticta sublimbata* näytteet jakoutuivat kymmeneen eri syanobakteerigenotyyppiin. Tämä voi osoittaa, että joidenkin lajien sieniosakkaat eivät ole yhtä valikoivia fotobionttinsa suhteen kuin toiset. Myös aiemmat tutkimukset esimerkiksi Pannaria-suvun jäkälillä ovat osoittaneet, että jotkut jäkälöityneet sienet selkeästi valikoivat fotobionttinsa ('selectivity in photobiont choice'), vaikka sama *Nostoc*-genotyyppi voi löytyä useammalta lajilta. (Fedrowitz ym. 2011, Elvebakk ym. 2008)

*Sticta sublimbata*-laji on alueella aineistoni mukaan selvästi yleisin laji, joten voin arvailla, että sen takia kyseisellä lajilla ei ole niin suurta tarvetta "kilpailla" symbionttikumppanista, vaikka samalla alueella elää useampia jäkälälajeja. Yllättävää oli se, että sekvensoimillani *Sticta*-suvun lajeilla oli yhteensä 21 genotyyppiltään erilaista fotobionttia, verrattaessa esimerkiksi Fedrowitzin ym. (2011) tutkimukseen: he tutkivat 232 *Nephroma*-suvun jäkälänäytettä, joiden sekovarsista löytyi ainoastaan 5 keskenään hyvin samankaltaista trnL-sekvenssiä.

Harmillisesti ihmistoiminnan seurauksena Taitavuorten metsäfragmentit pienenevät jatkuvasti, vieden jäkälien ja myös muun eliölajiston elintilaa. Jäkälien suojelutoimia varten alueen lajistoa tulisi tutkia myös jatkossa, sillä voidaan olettaa, että lajeja on paljon enemmän, kuin mitä nyt tunnetaan.

## 6. Loppusanat

Suurin kiitos kuuluu ohjaajalleni Ulla Kaasalaiselle, joka on kärsivällisesti ohjannut minua laboratoriotöissä, tietokoneohjelmien kanssa ja itse tutkielman kirjoittamisessa. Aina kun olen ollut avun tarpeessa, Ulla on ollut aina tavoitettavissa heti. En voisi olla enempää kiitollisempi Ullalle.

Kiitos myös toiselle ohjaajalleni Jouko Rikkiselle, jonka opeissa sain olla paikan päällä Taitalla tammikuussa 2019. Kenttäkurssi oli aivan mieletön kokemus.

Kiitokset myös rakkaille opiskelukavereille, joilta olen saanut tukea, voimaa ja rakkautta näiden pitkän kuuden opiskeluvuoden aikana. Kiitän eritoten Ida Särvää, Sanni Kurttia, Pauliina Hovilaista, Ella Rankista, Essi Törröstä, Saara Pesosta, Antti Karppista, Jemina Huuskosta ja Antti Vinkanharjua. Kiitos, että olette aina tukena.

Kiitos myös yliopistoelämän ulkopuolisille ystäville, jotka ovat kestäneet stressaantunutta Annaa ja jaksaneet aina kannustaa. Suuri kiitos myös isälle, äidille ja siskolle, jotka ovat tukeneet ja kannustaneet minua kohta 25 vuotta.

## 7. Lähteet

Ahmadjian, V. (1993). The Lichen Photobiont: What Can It Tell Us about Lichen Systematics? *The Bryologist*, 96(3), 310-313.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter. (2016) *Molecular Biology of the Cell*.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter. (2013) Molecular Biology of the Cell.

Bear R., Rintoul D., Snyder B., Smith-Caldas M., Herren C. (2016). Principles of biology. Luku 4.

Bowler, P. A., Rundel, P. W. (1975). Reproductive strategies in lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 70, Issue 4, June 1975, Pages 325–340

Brooks, T., Lens, L., De Meyer, M., Waiyaki, E., Wilder, C. (1998) Avian Biogeography of the Taita Hills, Kenya. *J. of East African Natural History*, 87(1):189-194

Burgess, N., Butyski, T., Cordeiro, N., Doggart, N., Fjeldså, J., Howell, K., Kilahama, F., Loader, S., Lovett, J., Mbilinyi, B., Menegon, M., Moyer, D., Nashanda, E., Perkin, A., Rovero, F., Stanley, W. & Stuart, S. (2006). Biological importance of the Eastern Arc Mountains of Tanzania and Kenya. *Biological Conservation* 134:209 -231

Bytebier, B. (2001). Taita Hills Biodiversity Project Report. *National Museums of Kenya, Nairobi*.

Elvebakk, A., Papaefthimiou, D., Robertsen, E. H., & Liaimer, A. (2008). Phylogenetic Patterns among Nostoc Cyanobionts within Biand Tripartite Lichens of the Genus Pannaria. *Journal of Phycology*, 44(4), 1049–1059. <https://doi-org.libproxy.helsinki.fi/10.1111/j.1529-8817.2008.00556.x>

Fedrowitz, K., Kaasalainen, U. & Rikkinen, J. 2011: Genotype variability of *Nostoc* symbionts associated with three epiphytic *Nephroma* species in a boreal forest landscape. *The Bryologist* 114: 220-230.

Feuerer T. & Hawksworth DL. 2007. Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. *Biodivers Conserv* 16: 85–98.

Huelsenbeck, J., P., Ronquist, F. (2001) *Bioinformatics Application Note*. Vol. 17 no. 8 p. 754-755.

Jauhiainen K. (2012). *Coccocarpia*-suvun jäkälien ja niiden syanobionttien monimuotoisuus Kenian Taitavuorilla ja Kasigau-vuorella. Maisterintutkielma, Helsingin yliopisto.

Jayalal, U,m Joshi, S., Oh, SO., Kim, JA., Koh, YJ., Crisan, F., Hur, JS. (2014). The lichen genus *Sticta* in South Korea. *Mycobiology*. Mar;42(1):6-11.

Kirika, P., Mugambi, G., Lücking, R., Lumsch, H. T. (2012). New Records of Lichen-Forming Funghi from Kenya.

Lange, C. D. (2006) The endemis land snail *Gulella taitensis* of the Taita Hills forests, Kenya; on the brink of extinction. Cambridge University Press, Volume 40 Issue 3, 362364

Layer, M., Rhodes, J. A. (2017). Phlyogenetic trees and Euclidean embeddings. *Journal of Mathematical Biology*, volume 74, 99-111

Lovett, J. & Wasser, (1993). Biogeography and Ecology of the Rain Forests of Eastern Africa. — Cambridge University Press, Cambridge.

Lumsch, H. T., Ahti, T., Altermann, S., Amo De Paz, G., Aptroot, A., Arup, U., Bárcenas P. A., Bawingan, P. A., Benatti, M. N., Betancourt, L., Björk, C. R., Boonpragob, K., Brand, M., Bungartz, F., Cáceres, M. E.S., Candan, M., Chaves, J., Clerc, P., Common,

R., Coppins, B. J., Crespo, A., Dal-Forno, M., Divakar, P. K., Duya, M. V., Elix, J. A., Elvebakk, A., Fankhauser, J. D., Farkas, E., Ferraro, L., Fischer, E., Galloway, D. J., Gaya, E., Giralt, M., Goward, T., Grube, M., Hafellner, J., Hernández M., J. E., Herrera Campos, M. De Los Angeles; Kalb, K., Kärnefelt, I., Kantvilas, G., Killmann, J. D., Kirika, P., Knudsen, K., Komposch, H., Kondratyuk, S., Lawrey, J. D., Mangold, A., Marcelli, M. P., McCune, B., Messuti, M. I., Michlig, A., González, R. M., Moncada, B., Naikatini, A., Nelsen, M. P., Øvstedal, D. O., Palice, Z., Papong, K., Parnmen, S., Pérez-Ortega, S., Printzen, C., Rico, V., J. Plata, E. R., Robayo, J., Rosabal, D., Ruprecht, U., Salazar Allen, N., Sancho, L., De Jesus, L. Santos. Vieira, T. Santos, Schultz, M., Seaward, M. R. D., Sérusiaux, E., Schmitt, I., Sipman, H. J. M. Sohrabi, M., Söchting, U., Sjøgaard, M. Z., Sparrius, L. B., Spielmann, A., Spribille, T., Sutjaritturakan, J., Thammathaworn, A., Thell, A., Thor, G., Thüs, H., Timdal, E., Truong, C., Türk, R., Umaña Tenorio, L., Upreti, D. K.; Van den Boom, P., Vivas Rebueta, M., Wedin, M., Will-Wolf, S., Wirth, V., Wirtz, N., Yahr, R., Yeshitela, K., Ziemmeck, F., Wheeler, T., Lücking, R. (2011) One hundred new species of lichenized fungi: a signature of undiscovered global diversity.

*Phytotaxa*. 18:1–127.

Lücking R., Moncada B., McCune B., Farkas E., Goffinet B., Parker D., Chaves J. L., Lókös L., Nelson P. R., Sproboöoe T., Stenroos S., Wheeler T., Yanez-Avabaca A., Dillman K., Gockman O. T., Goward T., Hollinger J., Tripp E. A., Villela J., Álvaro-Alba W. R., Arango C. J., Cáceres M. F. S., Coca L. F., Printzen C., Rodríguez C., Scharnagl K., Rozzi R., SotoMedna E., Yakovchenko L. S. (2017) *Pseudocyphellaria crocata* (Ascomycota: Lobariaceae) in the Americas is revealed to be thirteen species, and none of them is *P. crocata*. The Bryologist, 120(4):441-500

Malonza P. K., Lötters, S., Measey G. J. (2010) The Montane Forest Associated Amphibian Species of the Taita Hills, Kenya. *Journal of East African Natural History* 99(1), 47-63

Moncada, B., Lücking, R. (2014) Molecular phylogeny of the genus *Sticta* (lichenized Ascomycota: Lobariaceae) in Colombia. *Fungal Diversity*. 64. 10.1007/s13225-013-0230-0.

Moncada B., Lücking R. (2012) Ten new species of *Sticta* and counting: Colombia as a hot spot for unrecognized diversification in a conspicuous macrolichen genus. *Phytotaxa*. 74. 1-29. 10.11646/phytotaxa.74.1.1.

Moncada, B., Coca, L. F., Lücking, R. (2013). Neotropical members of *Sticta* (lichenized Ascomycota: Lobariaceae) forming photosymbiodemes, with the description of seven new species. *The Bryologist*, 116(2):169-200.

Nash III, T.H. (1996) *Lichen Biology*, Cambridge University Press, Cambridge.

Niemelä, T. (2012) *Vihreä Afrikka*. Luonnontieteellinen keskusmuseo, Helsinki.

Paulsrud, P., Lundblad P. (1998) Sequence Variation of the tRNA<sup>Leu</sup>Intron as a Marker for Genetic Diversity and Specificity of Symbiotic Cyanobacteria in Some Lichens. *Applied and Environmental Microbiology Jan 1998*, 64 (1) 310-315.

Paulsrud, P., Rikkinen, J., & Lindblad, P. (2000). Spatial patterns of photobiont diversity in some Nostoc-containing lichens. *New Phytologist*, 146(2), 291-299.

Pellaea: Fringed Moon Lichen. CC BY 2.0, <https://creativecommons.org/> Kuvat 6A ja 6B.

Pellikka, P. K. E, Clark, B. J. F. (2005). The Development of a Land Use Change Detection Methodology for Mapping the Taita Hills, South-East Kenya: Radiometric Corrections

Pellikka, P. (2005). Taita Hills: Kuivan savannin ympäröivät verheät vuoret kaakkois-Keniassa. *Turun yliopiston maantieteen laitoksen julkaisuja* 168: 75-90.

Rikkinen J. (2002) Cyanolichens: An Evolutionary Overview. In: Rai A.N., Bergman B., Rasmussen U. (eds) *Cyanobacteria in Symbiosis*. Springer, Dordrecht

Rikkinen, J. 2004. Ordination analysis of tRNA<sup>Leu</sup> (UAA) intron sequences from lichenforming *Nostoc* strains and other cyanobacteria. *Acta Univ. Ups. Symb. Bot. Ups.* **34**: 377– 91

Rikkinen, J. (2007) Relations Between Cyanobacterial Symbionts in Lichens and Plants. In: Pawlowski K. (eds) Prokaryotic Symbionts in Plants. *Microbiology Monographs*, vol 8. Springer, Berlin, Heidelberg.

Rikkinen, J. (2015). Taitan vuoristometsien siemenkasveja (Seed plants of montane forests in Taita Hills). *Luonnon Tutkija*, 119(2), 48-60.

Rikkinen, J. (2017). Cyanobacteria in terrestrial symbiotic systems. teoksessa P. Hallenbeck (Toimittaja), *Modern topics in the Phototrophic Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects* (Sivut 243-294). London: Springer International Publishing AG. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46261-5>

Rogo, L., Oguge, N. (2000) The Taita Hills Forest Remnants: A Disappearing World Heritage. *A Journal of the Human Environment* 29(8), 522-523

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C. A., Chew, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for funghi. 17;109(16):6241-6

Teacher, A. G. F., Griffiths, D. J. (2010). HapStar: automated haplotype network layout and visualization.

Thomas H. N. (2012) Lichen Biology.

Wanderflechten: Photomorph. CC BY-NC-ND 2.0, <https://creativecommons.org/> Kuva 4.

Wilder, C., Brooks, T., Lens, L. (1998) Vegetation Structure and Composition of the Taita Hills Forests. *J. of East African Natural History*, 87(1):181-187



Yangu, K. (2015) , <https://creativecommons.org/> Kuva 1.

<https://www.fluxus-engineering.com/>

<https://www.khanacademy.org/science/biology/her/tree-of-life/a/building-an-evolutionary-tree>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<http://nbisweden.github.io/MrBayes/index.html> <https://www.thermofisherscientific.com>

## 8. Liitteet

Liite 1. Tutkimus aineiston keruutiedot. Taulukkoon on myös merkitty, ne näytteet, joista on sekvensoitu sieniosakkaan ITS-geenialue ja syanobakteeriosakkaan trnL Leu (UAA)-introni.

Olen korostanut sinisellä ne näytteet, joiden sekvenssit saatiin tässä tutkimuksessa.

	A	B	C	D	E	F
1	Näyttenumero	Keruupaikka		Laji	ITS	trnL
32	AP43 JR16358	Vurian etelärinne	Sticta	fuliginosa	x	x
33	AP42 JR16366	Vurian etelärinne	Sticta	aff. ambavillaria	x	x
34	AP46 JR16368	Vurian etelärinne	Sticta	tomentosa	x	x
35	AP44 JR16373	Vurian etelärinne	Sticta	sublimbata	x	x
36	AP51 16374a	Vurian etelärinne	Sticta	sublimbata	x	x
37	AP52 16374b	Vurian etelärinne	Sticta	duplolumbata	x	x
38	AP54 16374d	Vurian etelärinne	Sticta	duplolumbata	x	x
39	AP53 JR16375c (T.	Vurian etelärinne	Sticta	sublimbata	x	x
40	AP24 JR16417	Mbololo	Sticta	sublimbata	x	x
41	AP26 JR16419	Mbololo	Sticta	sublimbata	x	x
42	AP21 JR16420	Mbololo	Sticta	sublimbata	x	x
43	AP16 JR16439	Mbololo	Sticta	weigeli	x	x
44	AP10 JR16440	Mbololo	Sticta	fuliginosa	x	x
45	AP15 JR16443	Mbololo	Sticta	sublimbata	x	x
46	AP11 JR16457	Mbololo	Sticta	cyphellulata	x	x
47	AP9 JR16462	Mbololo	Sticta	weigeli	x	x
48	AP25 JR16463	Mbololo	Sticta	fuliginosa	x	x
49	AP66	Ngangao	Sticta	sp.	o	x
50	AP62 JR19	Yale	Sticta	sublimbata	x	x
51	AP61	Vuria (matalampi huippu)	Sticta	sp.	o	x
52	AP70 JR25	Yale	Sticta	sublimbata	x	x
53	AP59	Yale	Sticta	sp.	o	x
54	AP56 JR3	Yale	Sticta	fuliginosa	x	x
55	AP27	Ngangao	Sticta	sp.	o	x
56	AP12	Ngangao	Sticta	sp.	o	x
57	AP31	Vuria (matalampi huippu)	Sticta	sp.	o	x
58	AP32	Vuria (matalampi huippu)	Sticta	sp.	o	x
59	AP14	Vuria (saniametsä)	Sticta	sp.	o	x
60	AP30	Mbololo	Sticta	sp.	o	x
61	AP57	Yale	Sticta	sp.	o	x

	A	B	C	D	E	F
1	Näyttenumero	Keruupaikka		Laji	ITS	trnL
2	AP17	Maktau Hill	Sticta	sp.	o	x
3	AP1	Kasigau	Sticta	sp.	o	x
4	AP2	Kasigau	Sticta	sp.	o	x
5	AP3	Kasigau	Sticta	sp.	o	x
6	AP4	Kasigau	Sticta	sp.	o	x
7	AP5	Kasigau	Sticta	sp.	o	x
8	AP6	Kasigau	Sticta	sp.	o	x
9	AP7	Kasigau	Sticta	sp.	o	x
10	AP8	Kasigau	Sticta	sp.	o	x
11	AP35	Maktau Hill	Sticta	sp.	o	x
12	AP29	Maktau Hill	Sticta	sp.	o	x
13	AP38	Yale	Sticta	sp.	o	x
14	AP41	Mount Elgon, Erica zone	Sticta	sp.	o	x
15	AP36 JR16102	Mount Elgon, Erica zone	Sticta	aff. Pseudosylvatica	x	x
16	AP40	Mount Elgon, Erica zone	Sticta	Sticta sp.	o	x
17	AP37 JR16107	Mount Elgon, Erica zone	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
18	AP55 JR16108	Mount Elgon, Erica zone	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
19	AP19 JR16201a	Fururu B (pieni metsä laaksossa)	Sticta	weigeli	x	x
20	AP20 JR16201b	Fururu B (pieni metsä laaksossa)	Sticta	weigeli	x	x
21	AP23 JR16248	Mbololo	Sticta	cyphellulata	x	x
22	AP22 JR16275	Sagallan luonnonmetsä	Sticta	sublimbata	x	x
23	AP18 JR16295	Sagallan luonnonmetsä	Sticta	weigeli	x	x
24	AP13 JR16310	Sagallan luonnonmetsä	Sticta	weigeli	x	x
25	AP28 JR16312	Sagallan luonnonmetsä	Sticta	cyphellulata	x	x
26	AP34 JR16322	Sagallan luonnonmetsä	Sticta	ciliata	x	x
27	AP33 JR16322a	Sagallan luonnonmetsä	Sticta	cyphellulata	x	x
28	AP50 16335	Sagallan luonnonmetsä	Sticta	fuliginosa	x	x
29	AP47 JR16352	Vurian etelärinne	Sticta	tomentosa	x	x
30	AP49 JR16354	Vurian etelärinne	Sticta	fuliginosa	x	x
31	AP39 JR16355	Vurian etelärinne	Sticta	sublimbata	x	x

	A	B	C	D	E	F
1	Näyttenumero	Keruupaikka		Laji	ITS	trnL
62	AP71 JR68a	Vuria	Sticta	duplolimkata	x	x
63	AP58 JR69	Vuria	Sticta	duplolimkata	x	x
64	AP68 JR81	Vuria	Sticta	sublimkata	x	x
65	AP60	Yale	Sticta	sp.	o	x
66	AP67	Yale	Sticta	sp.	o	x
67	AP69 JR95	Yale	Sticta	sublimkata	x	x
68	AP72	Vuria, Plot 90	Sticta	sp.	o	x
69	AP63	Vuria, Plot 90	Sticta	sp.	o	x
70	AP65	Vuria, Plot 94	Sticta	sp.	o	x
71	AP64	Vuria, Plot 94	Sticta	sp.	o	x
72	JR10112	Vuria	Sticta	aff. ambavillaria	x	x
73	JR10121B	Vuria	Sticta	aff. ambavillaria	x	x
74	JR10189	Yale	Sticta	aff. ambavillaria	x	x
75	JR09D8A	Ngangao	Sticta	aff. ciliata	x	x
76	JR10060C	Shomoto Hill	Sticta	aff. ciliata	x	x
77	JR10117	Vuria	Sticta	aff. colombiana	x	x
78	JR10193A	Yale	Sticta	cyphellulata	x	x
79	JR10193B	Yale	Sticta	cyphellulata?	x	x
80	JR_58:7	Kasigau	Sticta	cyphellulata	x	x
81	JR09D12A	Ngangao	Sticta	cyphellulata	x	x
82	JR110055	Vuria, Plot 94	Sticta	cyphellulata	x	x
83	JR10028B	Vuria, Plotin 91 yläpuolinen harjan	Sticta	cyphellulata	x	x
84	JR110030A	Vuria, Plotin 91 yläpuolinen harjan	Sticta	cyphellulata	x	x
85	JR10202B	Yale	Sticta	cyphellulata	x	x
86	JR10176A	Yale	Sticta	cyphellulata	x	x
87	JR090X8b	Chawia	Sticta	cyphellulata?	x	x
88	JR090X8a	Chawia	Sticta	cyphellulata?	x	x
89	JR10193C	Yale	Sticta	cyphellulata?	x	x
90	JR10202C	Yale	Sticta	cyphellulata?	x	x
91	UK110501a	Ngangao	Sticta	cyphellulata	x	x
	A	B	C	D	E	F
1	Näyttenumero	Keruupaikka		Laji	ITS	trnL
92	JR10K302	Kasigau	Sticta	(aff.?) dichotoma	x	x
93	JR10K303	Kasigau	Sticta	(aff.?) dichotoma	x	x
94	JR10194C	Yale	Sticta	duplolimkata	x	x
95	JR10194A	Yale	Sticta	duplolimkata	x	x
96	JR10194B	Yale	Sticta	duplolimkata	x	x
97	JR10212A	Yale	Sticta	duplolimkata	x	x
98	JR09A46	Ngangao	Sticta	fuliginosa	x	x
99	JR10076	Vuria	Sticta	fuliginosa	x	x
100	JR10245	Mwachora	Sticta	fuliginosa	x	x
101	JR09D21B	Ngangao	Sticta	fuliginosa	x	x
102	JR10190B	Yale	Sticta	fuliginosa	x	x
103	JR10151	Yale	Sticta	fuliginosa	x	x
104	JR_105A	Vuria	Sticta	fuliginosa	x	x
105	JR_105B	Vuria	Sticta	fuliginosa	x	x
106	JR10034B	Shomoto Hill	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
107	JR10034A	Shomoto Hill	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
108	JR10060B	Shomoto Hill	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
109	JR10070C	Vuria	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
110	JR10057	Shomoto Hill	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
111	JR10155A	Yale	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
112	JR10171	Yale	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
113	JR10155B	Yale	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
114	JR10155C	Yale	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
115	JR10044A	Shomoto Hill	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
116	UK110551f	Fururu	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
117	UK110551g	Fururu	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
118	JR10070A	Vuria	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
119	JR10070B	Vuria	Sticta	aff. pseudosylvatica	x	x
120	JR09Y15b	Mbololo	Sticta	sublimkata	x	x

	A	B	C	D	E	F
1	Näyttenumero	Keruupaikka		Laji	ITS	trnL
121	JR09Y12a	Mbololo	Sticta	sublimbata	x	x
122	JR10253B	Mwachora	Sticta	sublimbata	x	x
123	JR10253C	Mwachora	Sticta	sublimbata	x	x
124	JR10253A	Mwachora	Sticta	sublimbata	x	x
125	JR10147B	Ngangao	Sticta	sublimbata	x	x
126	JR10147A	Ngangao	Sticta	sublimbata	x	x
127	JR09D6A	Ngangao	Sticta	sublimbata	x	x
128	JR09Z2	Ngangao	Sticta	sublimbata	x	x
129	JR10195	Yale	Sticta	sublimbata	x	x
130	JR10208A	Yale	Sticta	sublimbata	x	x
131	JR10214B	Yale	Sticta	sublimbata	x	x
132	JR10216C	Yale	Sticta	sublimbata	x	x
133	JR09W5Cb	Kasigau	Sticta	sublimbata	x	x
134	JR09W12	Kasigau	Sticta	sublimbata	x	x
135	UK110547a	Fururu	Sticta	sublimbata	x	x
136	UK110547b	Fururu	Sticta	sublimbata	x	x
137	JR10281C	Macha	Sticta	sublimbata	x	x
138	JR10282B	Macha	Sticta	sublimbata	x	x
139	JR10276N	Macha	Sticta	sublimbata	x	x
140	JR10220B	Mwachora	Sticta	sublimbata	x	x
141	JR10220D	Mwachora	Sticta	sublimbata	x	x
142	JR09Z4	Ngangao	Sticta	sublimbata	x	x
143	JR09A60	Ngangao	Sticta	sublimbata	x	x
144	JR10066C	Shomoto Hill	Sticta	sublimbata	x	x
145	JR10039A	Shomoto Hill	Sticta	sublimbata	x	x
146	JR10039B	Shomoto Hill	Sticta	sublimbata	x	x
147	JR10039C	Shomoto Hill	Sticta	sublimbata	x	x
148	JR10066A	Shomoto Hill	Sticta	sublimbata	x	x
149	JR10228D	Mwachora	Sticta	sublimbata	x	x
	A	B	C	D	E	F
1	Näyttenumero	Keruupaikka		Laji	ITS	trnL
150	JR10230A	Mwachora	Sticta	sublimbata	x	x
151	JR10230B	Mwachora	Sticta	sublimbata	x	x
152	JR09Z1	Ngangao	Sticta	sublimbata	x	x
153	JR10184	Yale	Sticta	sublimbata	x	x
154	JR10191	Yale	Sticta	sublimbata	x	x
155	JR10216A	Yale	Sticta	sublimbata	x	x
156	JR10216B	Yale	Sticta	sublimbata	x	x
157	JR09D5	Ngangao	Sticta	sublimbata	x	x
158	JR09W11	Kasigau	Sticta	sublimbata	x	x
159	JR10220A	Mwachora??	Sticta	sublimbata	x	x
160	JR10234A	Mwachora	Sticta	sublimbata	x	x
161	JR10241	Mwachora	Sticta	sublimbata	x	x
162	JR10262A	Mwachora	Sticta	sublimbata	x	x
163	JR10262B	Mwachora	Sticta	sublimbata	x	x
164	JR10066B	Shomoto Hill	Sticta	sublimbata	x	x
165	JR10032A	Shomoto Hill	Sticta	sublimbata	x	x
166	JR10032B	Shomoto Hill	Sticta	sublimbata	x	x
167	JR10260	Mwachora	Sticta	tomentosa	x	x
168	JR10095A	Vuria	Sticta	tomentosa	x	x
169	JR10122	Vuria	Sticta	tomentosa	x	x
170	UK110523b	Vuria	Sticta	tomentosa	x	x
171	JR10086	Vuria	Sticta	tomentosa	x	x
172	JR090X3	Chawia	Sticta	weigeli	x	x
173	JR10212B	Yale	Sticta	weigeli	x	x
174	JR10180B	Yale	Sticta	weigeli	x	x
175	JR09DA	Ngangao	Sticta	sp.	o	x
176	JR10118	Vuria	Sticta	sp.	o	x

## Liite 2.

trnL-alueen monistamisessa käytetty PCR-mastermix ja lämpösykli.

	DNA Ext	MM	Näyte	V (µl) = 50			
				tRNA <sup>Leu</sup> out	10	µl/näyte	c/reaktio
1	AP1	49	1	Vesi	382,5	38,25	
2	AP2	" "	" "	10x Buffer	50,0	5	0,10
3	AP3	" "	" "	dNTPs (10 mM)	10,0	1	0,2 mM
4	AP4	" "	" "	tRNA <sup>Leu</sup> out1 (50 µM)	10,0	1	1 µM
5	AP5	" "	" "	tRNA <sup>Leu</sup> out2 (50 µM)	10,0	1	1 µM
6	AP6	" "	" "	BSA (20 mg/ml)	12,5	1,25	0,5 mg/ml
7	AP7	" "	" "	Dynazyme II (2 U/µl)	15,0	1,5	0,03 U/µl
8	AP8	" "	" "	Näyte		1	
9	-	" "	" "	V= 490			
				94 °C 3 min			
				94 °C 30 s			
				55 °C 30 s		x 4	
				72 °C 2 min			
				94 °C 30 s			
				60 °C 30 s		x 26	
				72 °C 2 min			
				72 °C 10 min			

ITS-alueen monistamisessa käytetty PCR-mastermix ja lämpösykli.

	DNA Ext.	MM	Näyte	V (µl) = 50			
				Sieni ITS	10	µl/näyte	c/reaktio
1	AP1	49	1	Vesi	400,0	40	
2	AP2	" "	" "	10x Buffer	50,0	5	0,10
3	AP3	" "	" "	dNTPs (10 mM)	10,0	1	0,2 mM
4	AP4	" "	" "	ITS_1F (50 µM)	5,0	0,5	0,5 µM
5	AP5	" "	" "	ITS_4R (50 µM)	5,0	0,5	0,5 µM
6	AP6	" "	" "	BSA (20 mg/ml)	12,5	1,25	0,5 mg/ml
7	AP7	" "	" "	Dynazyme II (2 U/µl)	7,5	0,75	0,03 U/µl
8	AP8	" "	" "	Näyte		1	
9	-	" "	" "	V= 490			
				94 °C 2 min			
				94 °C 30 s			
				57 °C 30 s		x 35	
				72 °C 30 s			
				72 °C 10 min			